

Comparison of metabolic flux analysis using isotopomer distribution with gene and protein expressions

(九工大・情工) ○ ヤン チェン、花 強、清水和幸

【Objective】 To provide much detailed physiological characterization of an organism and much valuable information for rational metabolic engineering strategies, precise quantitation of metabolic flux responses to genetic or environmental alterations is needed. In order to develop a better understanding of biological phenomena and the functional architecture of genomes and gene networks, analyses of gene expression patterns at the transcript and protein levels are considered to be necessary and complementary to metabolic pathway analysis.

【Methods and Results】 Combination of the information available from isotopomer measurements (GC-MS and 2D NMR) with the information obtained from metabolic balancing was used to investigate the central carbon metabolism of *Synechocystis* grown under different trophic conditions. This method enabled both flux directions of bi-directional steps or the reaction rates in metabolic cycles to be quantitated. Furthermore, the transcript levels and protein profiles of *Synechocystis* were investigated by using semi-quantitative RT-PCR and 2D electrophoresis. The availability of light energy was found to affect the expression of a great variety of cellular proteins and the transcript abundance of several genes. The gene expression and regulation in the central metabolism of *Synechocystis* were further analyzed by the comparison of above results.

【Key words】 metabolic system analysis, isotopomer, NMR, gene expression

Ralstonia eutropha H16由来(R)特異的エノイル-CoAヒドラターゼ遺伝子のクローニングとその解析

(理研・高分子化学) ○田口一徳、柘植丈治、土肥義治

【目的】 水素細菌である *Ralstonia eutropha* は、生分解性ポリエステルであるポリヒドロキシブタン酸(PHB)を、糖や油脂を炭素源として効率よく蓄積することが知られている。一方、*Ralstonia eutropha* PHB-4株(PHB重合酵素遺伝子欠損株)に他の細菌由来のポリヒドロキシアルカン酸(PHA)重合酵素遺伝子を導入すると、脂肪酸や油脂を炭素源として中鎖鎖の3-ヒドロキシアルカン酸ユニットからなるPHA (mcl-PHA)が生産される。これは、元来 *R. eutropha* に重合酵素の基質となる3-ヒドロキシアシル-CoA (3HA-CoA)の供給能が有することを示唆している。本研究では、*R. eutropha*の脂肪酸を炭素源としたPHA生合成における未解明のモノマー供給経路を解明することを目的としている。

【方法および結果】 遺伝子データベース(DDBJ)における検索から、*R. eutropha*の細胞内3HBオリゴマー加水分解酵素遺伝子の下流座に、*Aeromonas caviae*の3HA-CoA供給酵素であるエノイル-CoAヒドラターゼとアミノ酸レベルで高い相同性のある領域が確認できた。この領域をPCRで増幅、ラベリングしたのちプローブとして *R. eutropha*の染色体遺伝子に対するサザン解析を行ったところ、明確なシグナルが得られ、これに相当するDNA断片を取得した。この断片と *Pseudomonas* sp. 61-3由来PHA重合酵素遺伝子とともに大腸菌 *Escherichia coli* LS5218株に導入し培養したところ、PHAの蓄積が確認できた。このことから取得された遺伝子はモノマー供給に関与していることが明らかとなった。

Cloning and characterization of (R)-specific enoyl-CoA hydratase gene in *Ralstonia eutropha* H16.

○Kazunori Taguchi, Takeharu Tsuge, Yoshiharu Doi (Polym. Chem. Lab., RIKEN)

【Key words】 polyhydroxyalkanoate, *Ralstonia eutropha*, enoyl-CoA, hydratase, biosynthesis